

Acetylcholinesterase aus dem Gift von *Bungarus multicinctus*. Reinigung und Eigenschaften

The Acetylcholinesterase of *Bungarus multicinctus* Venom.
Purification and Properties

H. Großmann, M. Weinert * und M. Liefländer

Institut für Chemie der Universität Regensburg

Z. Naturforsch. **34 c**, 27–32 (1979) ; eingegangen am 2. November 1978

Acetylcholinesterase, Snake Venom, *Bungarus multicinctus*, Affinity Chromatography, Isozymes

Acetylcholinesterase from Banded krait (*Bungarus multicinctus*) venom has been purified by CM-Sephadex chromatography and affinity chromatography to a specific activity of 4290 U/mg. The purified enzyme is a glycoprotein. It is free of electrophoretically detectable contaminating proteins. A molecular weight of $140\,000 \pm 5\,000$ has been determined by gradient gel electrophoresis for the native enzyme. It is split into two equal-sized subunits ($M_r\ 70\,000 \pm 2\,000$) by SDS treatment. The N-terminal amino acid analysis gave glycine and serine. The purified acetylcholinesterase can be resolved by disc gel electrophoresis into four and by isoelectric focusing into six isozymes. The pI value of the main isozyme has been found to be 5.98 ± 0.05 .

Acetylcholinesteraseaktivität wurde zum ersten Mal von Iyengar *et al.* [1] im Schlangengift und zwar bei der Kobra gefunden. Nach Zeller [2] kommt das Enzym im Gift vieler Giftnattern (*Elapidae*) vor. Kumar und Elliott [3, 4] gelang es als ersten, die Acetylcholinesterase aus dem Gift einer Schlange, nämlich des Krait (*Bungarus fasciatus*), zu isolieren. Wir beschreiben in der vorliegenden Arbeit die Reinigung und Eigenschaften des Enzyms aus dem Gift des gestreiften Krait (*Bungarus multicinctus*). Die Acetylcholinesterase dieser Bungarus-spezies war bisher nur elektrophoretisch abgetrennt [5], nicht aber rein dargestellt worden; ihre spezifische Aktivität ist im Rohgift rund achtmal höher als die des Enzyms im Kobragift [5, 6].

Material und Methoden

1. Materialien

Gefriergetrocknetes Gift von *Bungarus multicinctus* wurde von den Miami Serpentarium Laboratories

(Miami, Florida, USA) bezogen und bei $-25\ ^\circ\text{C}$ gelagert. CM-Sephadex C-25 und Sepharose 4B sind von der Deutschen Pharmazie (Freiburg), die Vergleichsproteine zur Molekulargewichtsbestimmung von Boehringer Mannheim GmbH, Phosphatidyl-äthanolamin und Phosphatidylserin aus Rinderhirn von Koch-Light Laboratories Ltd. (Colnbrook, England), Dimethylformamid (Silylation Grade) und N-Ethylmorpholin (Sequanal Grade) von Pierce Eurochemie B. V. (Rotterdam, Holland). Alle anderen Chemikalien stammen von den Firmen Merck (Darmstadt) oder Serva (Heidelberg). Tetramethylammoniumchlorid wurde aus Äthanol/Essigester umkristallisiert. Es wurde nur mit quarzbidestilliertem Wasser gearbeitet. Zur Chromatographie der Dansyl-Aminosäuren wurden DC-Fertigfolien A 1700 Mikropolyamid von Schleicher & Schüll (Dassel) und zur Elektrofokussierung Ampholine PAGplates von LKB Instrument GmbH (Gräfelfing) verwendet.

2. Bestimmung der Enzymaktivität und Proteinkonzentration

Zur Aktivitätsbestimmung wurde routinemäßig die photometrische Methode von Ellman [7] mit Acetylthiocholin als Substrat (0,48 mM) angewandt; die Bestimmung erfolgte bei $25\ ^\circ\text{C}$. Stark aktive Enzymlösungen wurden mit 0,01-proz. BSA in 0,15 M NaCl verdünnt. 1 Aktivitätseinheit (U) entspricht dem Umsatz von $1\ \mu\text{mol}$ Substrat pro Minute. Proteinkonzentrationen wurden mit einer abgewandelten Lowry-Methode [8] bestimmt.

* Gegenwärtige Anschrift: Firma E. Merck, Darmstadt.

Enzym: Acetylcholinesterase, Acetylcholin-Hydrolase (E. C. 3.1.1.7).

Abkürzungen: BSA, Rinderserumalbumin; Dansyl-, 5-Dimethylamino-1-naphthalinsulfonyl-; DTNB, 5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure); SDS, Natriumdodecylsulfat.

Sonderdruckanforderungen an Dr. H. Großmann, Universität Regensburg, Institut für Chemie, Universitätsstraße 31, D-8400 Regensburg.



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitalized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

3. Synthese des Inhibitors und Herstellung des Affinitätsgels

Die Synthese des Acetylcholinesteraseinhibitors *m*-[6-(6-Aminocaproylamino)caproylamino]phenyltrimethylammoniumbromid-hydrobromid und seine Kupplung an Sepharose 4B erfolgte wie früher [9] beschrieben.

4. Reinigung der Acetylcholinesterase

Alle Arbeitsgänge wurden bei 4 °C durchgeführt.

a) Ionenaustauschchromatographie an CM-Sephadex: Hier wurde nach Mebs *et al.* [10] verfahren. 500 mg Gift wurden in 5,0 ml 0,05 M Ammoniumacetatpuffer, pH 5,8 gelöst und auf eine Säule (2,0 × 19 cm) mit 60 ml CM-Sephadex C-25 aufgetragen, die mit diesem Puffer äquilibriert war. Die Säule wurde dann bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 35 ml/h mit einem linearen Gradienten von 350 ml des obigen Puffers gegen 350 ml 0,5 M Ammoniumacetatpuffer, pH 7,0 eluiert und das Eluat in Fraktionen zu 6 ml aufgefangen. Nach Erscheinen des α -Bungarotoxin-Peaks wurde die Gradientenelution abgebrochen und die restlichen Giftbestandteile mit 1,0 M Ammoniumacetatpuffer, pH 7,0 vollends auf einmal ausgewaschen. Alle Fraktionen mit einer höheren Acetylcholinesteraseaktivität als 20 U/ml wurden vereinigt, gegen zwei Portionen mit je 2 l 0,15 M NaCl in 0,01 M Phosphatpuffer, pH 7,4 dialysiert und 1 h bei 48 000 × *g* zentrifugiert. Der klare Überstand wurde affinitätschromatographisch weitergereinigt.

b) Affinitätschromatographie: Der Überstand wurde bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 20 ml/h über eine Säule (1,2 × 17,5 cm) mit 20 ml Affinitätsgel (Beladung 2,0 mmol Inhibitor/l) geschickt, die mit 0,15 M NaCl in 0,01 M Phosphatpuffer, pH 7,4 äquilibriert worden war. Dann wurde mit 300 ml desselben Puffers und mit 50 ml 0,5 M NaCl in 0,01 M Phosphatpuffer, pH 7,4 nachgewaschen. Mit 0,2 M Tetramethylammoniumchlorid plus 0,5 M NaCl in 0,01 M Phosphatpuffer, pH 7,4 wurde die Acetylcholinesterase als scharfer Proteinpeak von der Säule eluiert. Zur Entfernung des Tetramethylammoniumchlorids wurde gegen 0,15 M NaCl in 0,01 M Phosphatpuffer, pH 7,4 dialysiert und anschließend 1 h lang bei 48 000 × *g* zentrifugiert. Die Affinitätssäule wird noch mit 1 M NaCl und 0,02 M NaN₃ in 0,01 M Phosphatpuffer, pH 7,4 ausgewaschen und kann dann wieder benutzt werden.

5. Untersuchungsmethoden

a) Polyacrylamid-Gelelektrophorese: Disk-Elektrophorese wurde in 5-proz. Gelen mit Tris/Glycinpuffer, pH 8,3 durchgeführt [11]. Lineare Gradientengele mit 4 bis 26% Monomergehalt wurden nach der Methode von Lorentz [12] hergestellt. Zur Molekulargewichtseichung wurden die mit Glutaraldehyd vernetzten Oligomeren des Rinderserumalbumins (*M_r* 68 000 und vielfaches davon) [13] benutzt. SDS-Gelelektrophorese wurde nach der Standardmethode von Weber *et al.* [14] in 5-proz. Gelen durchgeführt. Als Eichproteine zur Molekulargewichtsbestimmung dienten hier RNA-Polymerase (*M_r* 165 000, 155 000, 39 000), Phosphorylase a aus Kaninchenmuskel (*M_r* 100 000), Rinderserumalbumin (*M_r* 68 000), Katalase (*M_r* 58 000) und Chymotrypsinogen A (*M_r* 25 700).

Die Anfärbung auf Protein erfolgte mit Coomassie Brilliant Blue R 250 [14]. Esteraseaktivität wurde durch Spaltung von 1-Naphthylacetat und anschließende Kupplung mit Fast Blue RR lokalisiert [15]. Glykoproteide wurden mit Perjodsäure-Schiff-Reagenz [11] und Lipoproteide mit Sudanswarz B [11] angefärbt.

Die Gele wurden bei 560 nm (Proteinfärbung), 590 nm (Esteraseanfärbung) bzw. 545 nm (Zuckerfärbung) densitometrisch ausgemessen.

b) Isoelektrische Fokussierung: Die analytische Elektrofokussierung wurde auf Ampholine PAG-plates im pH-Bereich 3,5–9,5 durchgeführt [16]. Der pH-Gradient wurde mit einer Oberflächenglas-elektrode bestimmt. Anfärbung sowie densitometrische Auswertung erfolgten wie oben beschrieben.

c) Enzymkinetische Messungen: Für kinetische Messungen wurde außer dem Aktivitätstest nach Ellman [7] auch die pH-Stat-Methode von Heilbronn [17] mit zwei Syringen benutzt. Dabei wurden 30 ml einer Lösung vorgelegt, die 0,1 M an NaCl, 0,04 M an MgCl₂, 0,005-proz. an BSA und 10 bis 0,05 mM an Acetylcholinjodid war. Nach Einstellen der Lösung auf den gewünschten Titrations-pH wurde bei 25 oder 37 °C zehn Minuten lang die Nullrate bestimmt und dann die Reaktion durch Zugabe von 100 µl Enzymlösung in 0,01-proz. BSA gestartet.

Michaeliskonstanten wurden graphisch nach Lineweaver und Burk [18], Substratoptima durch Auftragen der Umsatzgeschwindigkeit gegen den Logarithmus der Substratkonzentration ermittelt. Hemmkonstanten wurden nach Dixon [19] mit Acetylthiocholin als Substrat bestimmt. Lipidaktivie-

rungsversuche nach Sihotang [20] wurden mit Rindererythrozytenlipid (mit *n*-Butanol nach *l. c.* [21] extrahiert), Phosphatidyläthanolamin und Phosphatidylserin durchgeführt.

d) Proteinchemische Untersuchungsmethoden: Zur Aminosäurenanalyse wurde das gereinigte Enzym zuerst gegen 0,1 M KCl, dann gegen bidest. Wasser dialysiert und anschließend gefriergetrocknet. Die Hydrolyse erfolgte mit konstant siedender Salzsäure in verschlossenen, evakuierten Glasröhrchen für 20, 48 oder 72 h bei 110 °C. Die Analysen wurden auf einem BioCal Aminosäureanalysator BC 201 durchgeführt. Cystein wurde nach Parameisensäureoxydation [22] als Cysteinsäure, Tryptophan spektrophotometrisch nach Beaven und Holiday [23] und Hydroxyprolin nach Bondjers und Björkerud [24] bestimmt. Zur Ermittlung der N-terminalen Aminosäuren wurde das gefriergetrocknete Enzym nach Gray [25] mit Dansylchlorid umgesetzt und hydrolysiert. Nach ihrer Extraktion wurden die fluoreszenzmarkierten Aminosäuren durch zweidimensionale Chromatographie auf polyamidbeschichteten Aluminiumfolien [26, 27] aufgetrennt und identifiziert.

Ergebnisse und Diskussion

Reinigung der Acetylcholinesterase (siehe auch Tabelle I)

Die spez. Aktivität der Acetylcholinesterase scheint im Rohgift von *Bungarus multicinctus* mit 30,7 U/mg etwas geringer zu sein als bei *Bungarus fasciatus* (35,2 U/mg) [4], die beiden Werte sind jedoch nur bedingt vergleichbar, da sie mit unterschiedlichen Testmethoden ermittelt wurden. Das Enzym wurde von CM-Sephadex festgehalten und konnte mit Ammoniumacetatkonzentrationen zwischen etwa 0,17 und 0,24 mol/l wieder eluiert werden (Abb. 1). Schon das Elutionsprofil zeigte, daß das Gift von *Bungarus multicinctus* mindestens drei verschiedene Acetylcholinesteraseformen enthält, die sich in ihrer

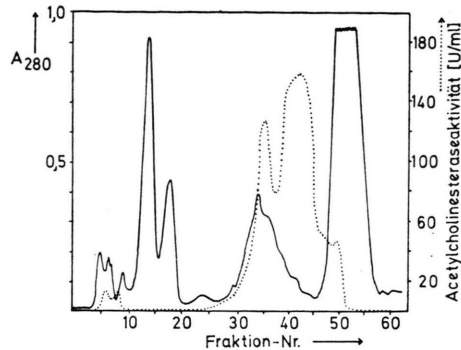


Abb. 1. Gradientenelution der Acetylcholinesterase von der CM-Sephadex-Säule. Aufgetragen sind die Absorption bei 280 nm (—) und die Acetylcholinesteraseaktivität in U/ml (· · ·) gegen die Fraktionsnummer.

Ladung unterscheiden. Obwohl die Fraktionen mit niedriger Acetylcholinesteraseaktivität verworfen wurden, fanden wir nach der Ionenaustauschchromatographie an CM-Sephadex eine höhere Gesamtaktivität als im Rohgift, ein Phänomen, das durch die Abtrennung eines im Gift ebenfalls vorhandenen Acetylcholinesterase-Inhibitors erklärt werden könnte.

m-[6-(6-Aminocaproylamino)caproylamino]phenyltrimethylammoniumbromid ist für die Acetylcholinesterase aus dem Gift des gestreiften Krait ein kompetitiver Hemmer ($K_i = 0,65 \pm 0,05 \mu\text{M}$). An Sepharose gekoppelt hält diese Verbindung das Enzym sehr gut fest: Bei der Affinitätschromatographie wurden 99,4% der aufgetragenen Aktivität gebunden. 92% ließen sich mit Tetramethylammoniumchlorid wieder eluieren, 3% anschließend noch mit 1 M NaCl (in Tab. I nicht berücksichtigt).

Das gereinigte Enzym wurde in 94% Ausbeute und 140-fach angereichert erhalten. Es hat eine spez. Aktivität von 4290 U/mg (Acetylthiocholin als Substrat, Ellman-Test) bzw. 6060 U/mg (Acetylcholin, pH-Stat-Test, pH 8,0, 25 °C). Bei 37 °C wurde mit dem pH-Stat-Test eine spez. Aktivität von 6210 U/mg ermittelt, während Kumar und Elliott [4] unter vergleichbaren Bedingungen für das Enzym aus *Bungarus fasciatus* 4512 U/mg fanden.

Tab. I. Reinigung der Acetylcholinesterase aus dem Gift von *Bungarus multicinctus* (Durchschnittswerte aus 5 Präparationen).

	Volumen [ml]	Proteinkonz. [mg/ml]	Gesamt- protein [mg]	Aktivität [U/ml]	Gesamt- aktivität [U]	Spez. Akt. [U/mg]	Anreicherungs- faktor	Ausbeute [%]
Rohgiftlösung	5,0	107	535	3285	16 440	30,7	—	100
CM-Sephadex-Säule	152	0,245	37,3	110,2	16 780	450	15	102
Affinitätssäule	12,0	0,301	3,61	1290	15 500	4290	140	94

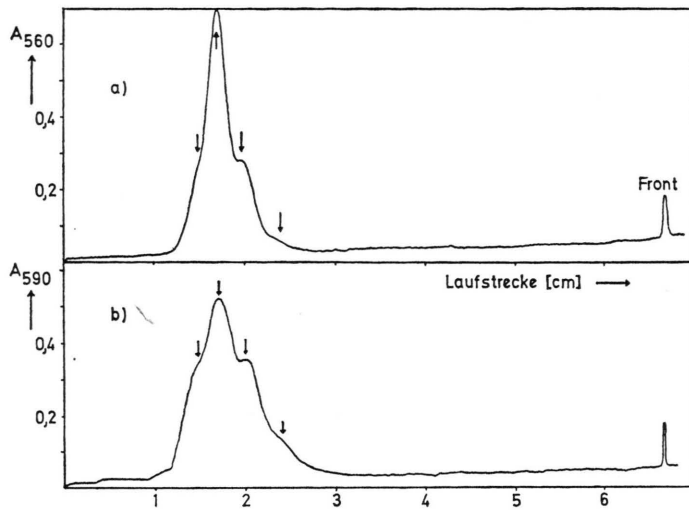


Abb. 2. Disk-Gelelektrophorese der gereinigten Acetylcholinesterase aus dem Gift von *B. multicinctus*. Die Pfeile zeigen die Lage der vier erkennbaren Banden. a) Coomassie-Färbung (6 μ g); b) Esterase-Anfärbung (5 U).

Molekulare Eigenschaften

Bei der *Disk-Elektrophorese* der gereinigten Acetylcholinesterase (Abb. 2 a und 2 b) fanden wir neben einer Haupt- noch drei Nebenbanden, die ebenfalls Esteraseaktivität besaßen und sich auf Zucker anfärben ließen. Diese Beobachtung ist in Übereinstimmung mit einer neueren Arbeit der Gruppe um Elliott [28], in der die diskelektrophoretische Auftrennung der Acetylcholinesterase aus *Bungarus fasciatus* in ebenfalls vier Banden beschrieben wird. Auch bei größeren Proteinmengen (50 μ g pro Gel) fiel die Sudanschwarzfärbung negativ aus; es scheint sich demnach bei der Acetylcholinesterase aus *Bungarus multicinctus* um kein Lipoprotein zu handeln.

Die gefundenen vier Acetylcholinesteraseformen unterscheiden sich höchstwahrscheinlich nur in ihrer Ladung, denn bei der *Gradientengelelektrophorese*, wo die Auftrennung praktisch nur nach Molekülgröße erfolgt, wurde nur eine, allerdings etwas asym-

metrische Bande gefunden (Abb. 3). Das Molekulargewicht des Enzyms im nativen Zustand wurde hierbei zu $140\,000 \pm 5\,000$ abgeschätzt.

Bei der *SDS-Gelelektrophorese* konnten auch bei Proteinmengen von 50 μ g pro Gel keine Verunreinigungen gefunden werden; in Gegenwart wie auch in Abwesenheit von Mercaptoäthanol als Disulfidbrücken spaltendes Reagenz wurde nur eine Bande gefunden. Das Molekulargewicht der entsprechenden Acetylcholinesterase-Untereinheit liegt bei $70\,000 \pm 2\,000$ (Abb. 4).

Eine weitere Bestätigung, daß sich die verschiedenen Acetylcholinesteraseisoenzyme nur ladungsmäßig unterscheiden, ergab die *isoelektrische Fokussierung* in Polyacrylamiddünnschichtgelen (Abb. 5 a bis c). Das gereinigte Enzym ließ sich hierbei in eine Hauptbande ($pI = 5,98 \pm 0,05$), zwei stärkere ($pI = 6,17 \pm 0,05$ und $5,84 \pm 0,06$) und drei sehr schwache Nebenbanden aufspalten. Lee et al. [28]

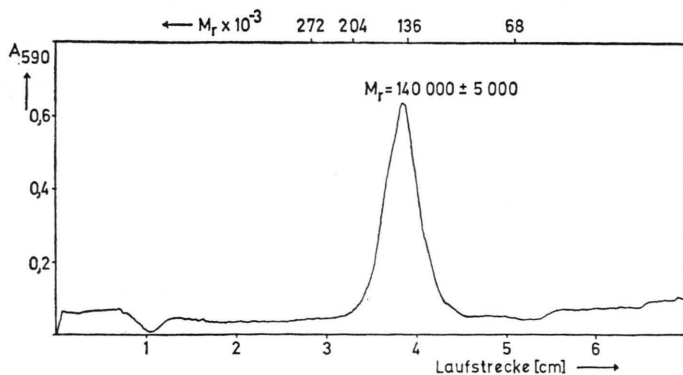


Abb. 3. Bestimmung des Molekulargewichts des gereinigten, nativen Enzyms durch Gradientenelektrophorese in Polyacrylamidgelen mit 4–26% Monomergehalt (Esterase-Anfärbung, 16 U). Oben sind die Laufstrecken der BSA-Oligomeren aufgetragen.

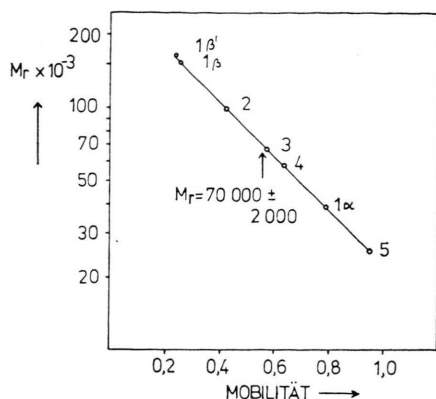


Abb. 4. Molekulargewichtsbestimmung der Acetylcholinesterase-Untereinheiten durch SDS-Gelelektrophorese. 1, RNA-Polymerase, M_r 39 000 (α -Kette), 155 000 (β), 165 000 (β'); 2, Phosphorylase a, M_r 100 000; 3, BSA, M_r 68 000; 4, Katalase, M_r 58 000; 5, Chymotrypsinogen A, M_r 25 700.

fanden bei dem Enzym aus *Bungarus fasciatus* zehn Banden mit isoelektrischen Punkten zwischen pH 4,3 und 5,3.

Enzymatische Eigenschaften

Das Enzym wird als wahre Acetylcholinesterase durch hohe Konzentrationen seines Substrats gehemmt. Die Michaeliskonstante für Acetylcholin ist $K_m = 43 \pm 4 \mu\text{M}$ (pH-Stat-Test; 0,1 M NaCl, 0,04 M MgCl_2 , 0,005% BSA, pH 8,0, 25 °C), das Substratoptimum liegt bei $830 \pm 60 \mu\text{M}$. Diese Werte liegen sehr nahe bei den für das Enzym aus *B. fasciatus* gefundenen [4]. Für Acetylthiocholin ist $K_m = 51 \pm 5 \mu\text{M}$ (photometrischer Test; 94 mM Phosphat, 0,31 mM DTNB, pH 8,0, 25 °C) und das Substratoptimum $480 \pm 90 \mu\text{M}$.

Die Lipidaktivierungsversuche ergaben folgende Ergebnisse: Wurde die Enzymprobe mit 0,01-proz. BSA in 0,15 M NaCl verdünnt, so wurde mit Erythrozytenlipid und Phosphatidyläthanolamin keine signifikante Aktivierung erzielt; Phosphatidylserin übte einen bis zu 90-proz. Hemmeffekt aus. Wurde das Enzym nur mit 0,15 M NaCl verdünnt, so war die Aktivität erheblich geringer als in Gegenwart von BSA. Dann aktivierten Erythrozytenlipid bis zu 30% und Phosphatidyläthanolamin bis zu 50%, es wurden aber dennoch nicht die Aktivitäten des in Gegenwart von BSA verdünnten Enzyms erreicht. Phosphatidylserin hingegen hemmte auch in Abwesenheit von BSA, und zwar bis zu 100%. Interessant ist hier der Vergleich mit der aus Rindererythrozyten solubili-

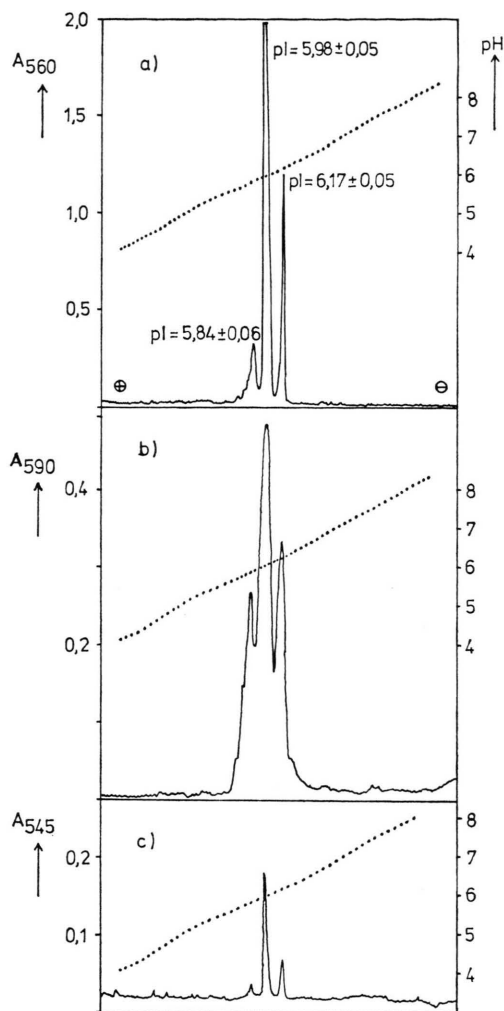


Abb. 5. Analytische Elektrofokussierung der gereinigten Acetylcholinesterase auf Polyacrylamiddünnschichtgelen. Der pH-Gradient ist gepunktet eingezeichnet. a) Coomassie-Färbung (16 μg); b) Esterase-Anfärbung (35 U); c) Zuckerfärbung (24 μg).

sierten Acetylcholinesterase [29], die durch Cardiolipin gehemmt und durch Phosphatidylserin aktiviert wird.

Die Stabilität des Enzyms ist in 0,01 M Phosphatpuffer, pH 7,4 in Gegenwart von 0,15 M NaCl nicht besonders gut; nach etwa zwei Wochen bei 4 °C nimmt die Aktivität rasch ab. In Gegenwart von 0,2 M Tetramethylammoniumchlorid und 0,5 M NaCl ist es sehr gut haltbar: Nach 250 Tagen und bei einer Proteinkonzentration von 0,35 mg/ml war noch kein Aktivitätsverlust feststellbar.

Tab. II. Aminosäurezusammensetzung der Acetylcholinesterase (Angaben in mol/100 mol).

	<i>Bungarus multicinctus</i> ^a	<i>Bungarus fasciatus</i> ^b
Asparaginsäure	11,1 ± 0,4	11,4
Threonin	4,9 ± 0,1	4,8
Serin	6,3 ± 0,4	6,7
Glutaminsäure	9,3 ± 0,2	9,5
Prolin	8,3 ± 0,3	8,6
Glycin	8,4 ± 0,3	8,6
Alanin	7,6 ± 0,3	7,6
Cystein	1,2 ± 0,05 ^c	0,95
Valin	6,0 ± 0,3	6,7
Methionin	2,0 ± 0,6	1,9
Isoleucin	3,8 ± 0,4	2,9
Leucin	10,1 ± 0,2	10,5
Tyrosin	3,8 ± 0,1	3,8
Phenylalanin	5,0 ± 0,05	5,7
Lysin	3,3 ± 0,2	2,9
Histidin	2,0 ± 0,1	1,9
Arginin	5,4 ± 0,2	5,7
Tryptophan	1,7 ^d	—

^a Mittelwerte aus 6 Analysen.^b Nach Kumar und Elliott [3]; auf Molprocente umgerechnet.^c Als Cysteinsäure nach Perameisensäureoxydation [22].^d Spektrophotometrisch [23].

Proteinchemische Untersuchungen

Als *N-terminale Aminosäuren* wurden Serin und Glycin bestimmt, während Kumar und Elliott [3] beim Enzym aus *Bungarus fasciatus* nur eine endständige Aminosäure (Leucin) fanden. Daraus ergibt sich, daß die beiden Untereinheiten vom Molekulargewicht 70 000 nicht identisch sein können.

Die Ergebnisse der *Aminosäurenanalyse* stehen in Tab. II und sind dort den Werten der Acetylcholinesterase aus *Bungarus fasciatus* gegenübergestellt. Signifikante Unterschiede sind nur bei Cystein, Valin, Isoleucin und Phenylalanin festzustellen. Der Hydroxyprolinegehalt ist mit $0,023 \pm 0,02\%$ praktisch gleich Null. Die Acetylcholinesterase aus dem Gift von *Bungarus multicinctus* hat also keine kollagenähnlichen Strukturen wie sie beim Enzym aus dem elektrischen Organ [30] gefunden wurden.

Wir danken Frau Edith Schindler und Fräulein Angelika Wozniowski für ihre zuverlässige Mitarbeit und der Deutschen Forschungsgemeinschaft für eine Sachbeihilfe.

- [1] N. K. Iyengar, K. B. Sehra, B. Mukerji u. R. N. Chopra, *Curr. Sci.* **7**, 51 (1938).
- [2] E. A. Zeller, *Helv. Chim. Acta* **32**, 94 (1949).
- [3] V. Kumar u. W. B. Elliott, *Prep. Biochem.* **3**, 569 (1973).
- [4] V. Kumar u. W. B. Elliott, *Eur. J. Biochem.* **34**, 586 (1973).
- [5] C.-C. Yang, W.-C. Chiu u. K.-C. Kao, *J. Biochem.* **48**, 706 (1960).
- [6] H. Großmann u. M. Liefländer, zur Veröffentlichung eingereicht.
- [7] G. L. Ellman, K. D. Courtney, V. Andres Jr. u. R. M. Featherstone, *Biochem. Pharmacol.* **7**, 88 (1961).
- [8] H. Stegemann, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **319**, 64 (1960).
- [9] H. Großmann u. M. Liefländer, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **356**, 663 (1975).
- [10] D. Mebs, K. Narita, S. Iwanaga, Y. Samejima u. C.-Y. Lee, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **353**, 243 (1972).
- [11] H. R. Maurer, *Disc Electrophoresis and Related Techniques of Polyacrylamide Gel Electrophoresis*, W. de Gruyter & Co., Berlin u. New York 1971.
- [12] K. Lorentz, *Anal. Biochem.* **76**, 214 (1976).
- [13] J. W. Payne, *Biochem. J.* **135**, 867 (1973).
- [14] K. Weber, J. R. Pringle u. M. Osborn, *Methods Enzymol.* **26**, 3 (1972).
- [15] B. Dewald, J. T. Dulaney u. O. Touster, *Methods Enzymol.* **32**, 82 (1974).
- [16] C. Karlsson, H. Davies, J. Öhman u. U.-B. Andersson, *LKB Application, Note No. 75* (1973).
- [17] E. Heilbronn, *Acta Chem. Scand.* **12**, 1879 (1958).
- [18] H. Lineweaver u. D. Burk, *J. Am. Chem. Soc.* **56**, 658 (1934).
- [19] M. Dixon, *Biochem. J.* **55**, 170 (1953).
- [20] K. Sihotang, *Eur. J. Biochem.* **63**, 519 (1976).
- [21] J. A. Cohen u. M. G. Warringa, *Biochim. Biophys. Acta* **10**, 195 (1953).
- [22] C. H. Hirs, *Methods Enzymol.* **11**, 197 (1967).
- [23] G. H. Beaven u. E. R. Holiday, *Adv. Protein Chem.* **7**, 319 (1952).
- [24] G. Bondjers u. S. Björkerud, *Anal. Biochem.* **52**, 496 (1973).
- [25] W. R. Gray, *Methods Enzymol.* **25**, 121 (1972).
- [26] E. Schulze u. V. Neuhoff, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **357**, 593 (1976).
- [27] H. G. Zimmer, V. Neuhoff u. E. Schulze, *J. Chromatogr.* **124**, 120 (1976).
- [28] S.-R. Lee, J. L. Latta u. W. B. Elliott, *Comp. Biochem. Physiol.* **56 C**, 193 (1977).
- [29] H. Großmann u. M. Liefländer, Veröffentlichung in Vorbereitung.
- [30] L. Anglister, S. Rogozinski u. I. Silman, *FEBS Lett.* **69**, 129 (1976).